ارزیابی اثر نانوذرات آهن بر بیان ژن‌های TEM و SHV در کلبسیلا پنومونیه جداشده از نمونه‌های بالینی با استفاده از تکنیک Real Time PCR

نجمه طهماسبی ابدر[1]، بابک خیرخواه[2*]

۱. گروه میکروبیولوژی ، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سیرجان، کرمان، ایران
۲. استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمان، کرمان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۵/۰۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۰۳)

چکیده

زمینه و هدف: کلبسیلاپنومونیه یک پاتوژن گرم منفی و عامل شایع عفونت‌های بیمارستانی است. افزایش ظهور مقاومت به چند دارو در کلبسیلا پنومونیه گزینه‌های درمانی را برای این باکتری محدود کرده است. هدف این تحقیق ارزیابی اثر نانوذرات آهن بر بیان ژن‌های TEM و SHV در کلبسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه‌های بالینی با استفاده ازتکنیک Real- Time PCR می‌باشد.

روش تحقق: تعداد ۵۰ سویه کلبسیلا پنومونیه ظرف مدت ۶ ماه، از بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌های شهر کرمان جمع آوری شد. ایزوله‌ها بر اساس تست‌های بیوشیمیایی موجود در سیستم API20E به عنوان کلبسیلا پنومونیه شناسایی شدند. تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن انجام گردید. جهت شناسایی مولکولی ژن‌های TEMو SHV، PCR انجام گردید. برای تعیین اثر بخشی نانو ذره آهن بر روی سویه‌های موردنظر، از روش براث دایلوشن طبق استاندارد CLSI استفاده و درنهایت Real-Time PCR صورت گرفت.

یافته‌ها: در این مطالعه تعداد ۴۶ نمونه از جدایه‌ها به صورت فنوتیپی مولد ESBL مثبت بودند. که ۴۸ درصد (۲۲ مورد) واجد ژن SHV، ۱۳ درصد (۶ مورد) واجد ژن TEM و ۳۹ درصد (۱۸ مورد) دارای هر دو ژن SHV +TEM بودند. نانوذره آهن توانست بیان ژن‌های TEM و SHV را در کلبسیلا پنومونیه کاهش دهد.

نتیجه‌گیری: با توجه به اثر بخش بودن نانوذرات آهن بر روی کلبسیلاهای بتالاکتاماز مثبت، می‌توان از نانوذره آهن بعنوان یک دوز دارویی استفاده کرد.

کلیدواژگان

Real Time PCR، SHV، TEM، کلبسیلا پنومونیه، نانو ذره آهن.

* نویسنده مسئول، رایانامه: babak.kheirkhah44@gmail.com

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه باکتری گرم منفی و متعلق به خانواده انتروباکتریاسه است که می تواند باعث طیف وسیعی از عفونت‌ها در انسان شود. اهمیت مقاومت آنتی بیوتیکی در عفونت‌های بیمارستانی به عنوان یک مشکل جدی برای بخش سلامت کشور مطرح بوده است که سالانه قربانی‌های زیادی را به خود اختصاص داده و هزینه‌های درمانی فراوانی بر سیستم‌های بهداشتی کشور تحمیل می کند(۱). از این رو سازمان بهداشت جهانی سال ۲۰۱۱ را به عنوان سال مقاومت آنتی بیوتیکی نامید.

مقاومت‌های بتالاکتامازی وسیع الطیف ESBL (Extended-Spectrum Beta-Lactamases) اغلب توسط ژن‌های پلاسمیدی کد گردیده و به راحتی در میان انواع باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه انتقال می یابند[۲]. شایعترین ESBLهای گزارش شده از کشورهای غربی و آسیایی، بتالاکتامازهای وسیع الطیف مشتق شده از ژن‌های TEM، CTX و SHV می باشند که بر روی پلاسمیدهای بزرگ قرار دارند و سویه‌های مقاوم به درمان را ایجاد می‌کنند [۳]. درمان عفونت‌های حاصل از باکتری‌های مولد این آنزیم‌ها بسیار مشکل است، چون از یک سو مقاومت به طیف وسیعی از سفالوسپورین‌ها مشاهده می‌شود و از سوی دیگر به علت اینکه بر روی پلاسمیدهای بزرگ قرار دارند که هم زمان حامل ژن‌های مقاومت به سایر عوامل ضد میکروبی مثل آمینوگلیکوزیدها، کلرامفنیکل، سولفونامیدها وتتراسایکلین نیز می‌باشند. این عفونت‌ها رابطه معنی داری با میزان مرگ و میر بیماران داشته و بار مالی زیادی را در پی دارند. بتالاکتامازهای CTX-M-I به طور فزاینده‌ای در کلبسیلا پنومونیه و اشریشیاکلی شایع شدند[۱و۲].

این آنزیم‌ها بر اساس تغییرات توالی آمینواسیدی به پنج گروه اصلی تقسیم می‌شوند که شامل CTX-M1, (CTX-M2, CTX-M8, CTX-M9, CTX-29) می‌باشند[۴]. این بتالاکتامازها ارتباط ژنتیکی کمی با اعضاء بتالاکتامازهای TEM و SHV دارند. بتالاکتاماز TEM، این آنزیم‌ها به زیرگروه‌های b_2، be_2، br_2 و ber_2 تعلق دارند و تعداد آن‌ها ۱۷۲ تا می‌باشد که اولین بار این آنزیم‌ها در اشریشیا کلی جدا شده از کشت خون یک بیمار یونانی به نام Temoniera گزارش گردید.[۵]. کلبسیلا پنومونیه در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و بسیاری از عوامل ضد باکتریایی مقاومت پیدا کرده اند که یکی از بزرگترین چالش‌های سلامتی در سراسر جهان است[۶ و۷]. تهیه نانوذرات ضد میکروبی می‌تواند تأثیر ارزشمندی در مقایسه با سنتز آنتی‌بیوتیک‌ها داشته باشد، زیرا آن‌ها پایداری بیشتر و طولانی مدتی دارند. در چند دهه اخیر، نانوذرات به دلیل ویژگی‌های جدید شامل بزرگ بودن نسبت سطح به حجم و فعالیت واکنشی بالا توجه زیادی پیدا کرده است. در میان نانوذرات دیگر، اخیرا به نانوذره آهن توجهات بیشتری شده است[۸]. نانوذرات ارزان به جای نانوذرات فلزی گران قیمت در سطح کاربردهای میکروالکتریکی پیشنهاد می‌شوند و احتمالاً آن‌ها آخرین مواد ضد میکروبی کشف شده اند. کاربردهای مواد ضد باکتریایی در صنعت منسوجات، ضدعفونی آب، پزشکی و بسته بندی‌های غذایی و غیره به خوبی شناخته شده است[۹]. برخلاف ضد عفونی کننده‌های شیمیایی معمول انتظاری نیست که نانو مواد ضد میکروبی، ضد عفونی کننده‌های مضر تولید کنند. همچنین قابلیت کنترل آلودگی و عفونت نانوآنتی‌بیوتیک‌ها در محیط آزمایشگاهی و سلول زنده کشف و اثبات شده است[۱۰]. نانوذرات می‌تواند در شرایط نامساعد مانند دمای بالای استریلیزاسیون، که تحت آن

آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم غیرفعال می‌شوند مقاومت کنند[۱۱]. نانو موادی که در تحویل آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شود دارای مزیت چندگانه مانند: توزیع شکل یکنواخت در بافت هدف، بهبود قابلیت حل شدن و رهاسازی کنترل شده و تحمیل می‌باشند. علاوه براین، گزارش شده که نانوذرات با اندازه کوچک فعالیت ضد میکروبی خوبی نشان داده است[۱۲]. نانوذرات از طریق واکنش الکترواستاتیکی می‌توانند به غشای باکتری متصل شوند و با غشای باکتری تداخل ایجاد کنند و باعث تخریب کامل غشای باکتری شوند[۶]. از آنجایی که تاکنون اثر نانو ذره آهن بر روی بیان ژن‌های بتالاکتامازی بررسی نشده است، لذا هدف این تحقیق ارزیابی اثر نانوذرات آهن بر بیان ژن‌های TEM و SHV در کلبسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه‌های بالینی با استفاده ازتکنیک Real- Time PCR می‌باشد.

روش تحقیق

در این مطالعه توصیفی - مقطعی در سال ۱۳۹۵ تعداد ۵۰ نمونه خون (حجم نمونه با استفاده از فرمول کوکران محاسبه شد) ظرف مدت شش ماه، به منظور شناسایی کلبسیلا پنومونیه از بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌های افضلی پور، شفا، باهنر و سیدالشهدای شهر کرمان جمع آوری شد. نمونه گیری از افراد، پس از مشخص نمودن هدف مطالعه برای آن‌ها و کسب رضایت کتبی آگاهانه از هر یک از افراد تحت مطالعه، صورت پذیرفت(کد اخلاق: IR.KMU.REC. 1396. 60). ایزوله‌ها بر اساس تست‌های بیوشیمیایی موجود در سیستم API20E به عنوان کلبسیلا پنومونیه شناسایی شدند. پس از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، کلنی‌هایی که ویژگی‌های کلبسیلا پنومونیه را داشتند، تست‌های بیوشیمیایی افتراقی شامل TSI، SIM، MR-VP، سیترات و اوره صورت گرفت و باکتری کلبسیلا پنومونیه جداسازی شد. محیط کشت‌های مصرفی از شرکت Merck (آلمان) و Himedia (هند) خریداری گردید.

تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی

حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های جدا شده به روش دیسک دیفیوژن براساس دستورالعمل CLSI سال 2013 انجام شد وآنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده شامل دیسک‌های ایمی پنم (µg ۱۰)، سفتازیدیم (µg ۳۰)، سفوتاکسیم(µg ۳۰)، سفتریاکسون (µg ۳۰)، سیپروفلوکساسین (µg ۵)، آمیکاسین (µg ۳۰)، آزترونام (µg ۳۰)، سفالوتین (µg ۳۰) بودند که از شرکت Himedia هند خریداری شد. بعد از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد، ایزوله‌های مولد ESBL از طریق ایجاد هاله عدم رشد به میزان حداقل ۵ میلی متر یا بیشتر در اطراف دیسک‌های سفتازیدیم کلاولانیک اسید یا سفوتاکسیم کلاولانیک اسید مشخص گردیدند.

استخراج DNA

پس از تعیین ایزوله‌هایی که از نظر فنوتیپی مثبت بودند، DNA نمونه‌های شناسایی شده به عنوان ESBL با استفاده از کیت (Qiagen, Hilden, Germany) استخراج گردید.

تست PCR

تست PCR با کیت Master mix (شرکت Takara، ژاپن) انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ ذکر گردیده است[۱۳]. جهت انجام PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در لوله‌های اپندروف از مخلوط کردن ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۳ میکرولیتر از DNA باکتری با غلظت ۵۰ نانوگرم، (۱۰pmol) ۱ میکرولیتر از هر یک پرایمرهای رفت و

برگشتی (جدول ۱) و ۷/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل استفاده شد و همچنین واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (peqStar 96 HPL Gradient) برای ژن SHV و TEM طبق برنامه (جدول ۲ و۳) انجام گردید.

جدول ۱- توالی اسید نوکلئوتیدی آغازگرهای مورد استفاده در تکنیک PCR (Lal et al 2007.)

ژن‌ها	توالی پرایمر		اندازه محصول ژن
SHV	F	5'- TCAGCGAAAAACACCTTG -3'	۴۷۱
	R	5'- CCCGCAGATAAATCACCA- 3'	
TEM	F	5'- GAGTATTCAACATTTCCGTGTC- 3'	۸۶۱
	R	5'- TAATCAGTGAGGCACCTATCTC- 3'	

جدول ۲- برنامه درجه حرارت و زمان جهت PCR ژن SHV

نام مرحله	درجه حرارت	مدت زمان	تعداد چرخه
واسرشت اولیه	۹۴°C	۵ دقیقه	۱
واسرشت ثانویه	۹۴°C	۴۵ ثانیه	۳۵
اتصال پرایمرها	۵۶°C	۳۵ ثانیه	
گسترش اولیه	۷۲°C	۴۵ ثانیه	
گسترش نهایی	۷۲°C	۵ دقیقه	۱

جدول ۳- برنامه درجه حرارت و زمان جهت PCR ژن TEM

نام مرحله	درجه حرارت	مدت زمان	تعداد چرخه
واسرشت اولیه	۹۴°C	۵ دقیقه	۱
واسرشت ثانویه	۹۴°C	۴۵ ثانیه	۳۵
اتصال پرایمرها	۶۰°C	۴۵ ثانیه	
گسترش اولیه	۷۲°C	۶۰ ثانیه	
گسترش نهایی	۷۲°C	۵ دقیقه	۱

پس از انجام آزمایش PCR محصولات PCR، در ژل آگارز ۱/۵٪ در بافر TBE ۱ x به مدت ۶۰ دقیقه با ولتاژ ۹۰ الکتروفورز شد و براساس باندی که محصولات PCR در دستگاه Geldocument مشاهده شد، مورد بررسی قرار گرفتند. از سویه کلبسیلا پنومونیه (ATCC 700603) بعنوان سویه کنترل مثبت و از سویه اشریشیاکلی(ATCC 25922) بعنوان سویه کنترل منفی استفاده شد.

آماده سازی محلول‌های نانو ذره آهن

نانو ذره آهن به صورت محلول کلوئیدی در یک ویال ۱ لیتری از شرکت نانو نصب پارس خریداری شد. از روش براث دایلوشن برای تعیین اثر بخشی نانو ذره آهن بر روی کلبسیلا پنومونیه دارای ژن‌های TEM و SHV طبق استاندارد CLSI انجام گردید. در غلظتی که مانع رشد باکتری شده و MIC50 هر یک از ایزوله‌ها تعیین شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

RNA توسط کیت استخراج RNX-plus solution (شرکت سیناکلون، کرج ایران) استخراج شد. جهت استخراج RNA، ۴۰۰ میکرولیتر محلول RNX سرد را به ۲×۱۰^{۶} سلول اضافه و در مرحله بعد ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به نمونه اضافه گردید. دراین مرحله کل RNA در فاز آبی در سطح قرار می‌گیرد. پروتئین‌ها در اطراف و مابقی اجزاء سلولی در قسمت پایین تر قرار می‌گیرند با استفاده از سمپلر و با دقت فازآبی جدا و به میکروتیوپ جدید منتقل گردید و یک میلی لیتر اتانول ۱۰۰ درصد به آن اضافه شد. ادامه مراحل طبق دستور العمل کیت مورد نظر انجام گردید. پس از استخراج RNA کمیت و کیفیت آن با روش UV اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس سنتز cDNA با

استفاده از کیت (TaKaRa cat. PRO37Q) انجام شد. ابتدا غلظت RNAهای استخراج شده توسط دستگاه نانو دراپ خوانده شد و طبق دستور کیت غلظت بدست آمده بر ۵۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر تقسیم شد که مقدار RNA لازم جهت سنتز cDNA در حجم ۱۰ میکرو لیتر مشخص گردید. به ازای هر حجم ۱۰ ماکرولیتری ۲ ماکرولیتر Primer Script Buffer (5x)، ۰/۵ ماکرولیتر از هر یک از محلول‌های RT-Enzyme، Oligo dT Primer، Random Hexamer استفاده شد و درنهایت حجم نهایی با DEPC water به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. جهت بررسی بیان ژن‌های SHV و TEM از روش Real-Time PCR توسط پرایمرهای ذکر شده در جدول ۴ استفاده شد [۱۳و۱۴]. این واکنش در حجم کلی ۲۰µl با استفاده از کیت شرکت Genet bio CAT. NO: Q9210 کره جنوبی به صورت زیر انجام شد: ۱۰ میکرولیتر از Prime Qmaster mix (2x) with syber green، پنج میکرو لیتر از Depc water، میکرو لیتر از پرایمر Forward ، یک میکرو لیتر از پرایمر Reverse، یک میکرولیتر از Rox dy و ۲ میکرولیتر از cDNA . تکثیر قطعه‌های موردنظر در دستگاه Real-time PCR مدل Corbett 5 Plex HRM شرکت Corbett استرالیا طبق برنامه جدول ۵ انجام شد. در این مطالعه از ژن خانه دار prob برای مقایسه با میزان بیان ژن هدف برای هر ایزوله استفاده شد. برای مشخص کردن بیان ژنی و رسم نمودارهای مربوطه از نرم افزار Rest استفاده شد. به منظور تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات حاصل از نتایج، از نرم افزار آماری SPSS ورژن ۱۸ استفاده شد($p<0/05$).

جدول ٤- توالی اسید نوکلئوتیدی آغازگرهای مورد استفاده در تکنیک Real- Time PCR

پرایمر	توالی پرایمر	
SHV	F	TCAGCGAAAAACACCTTG
	R	CCCGCAGATAAATCACCA
TEM	F	GAGTATTCAACATTTCCGTGTC
	R	TAATCAGTGAGGCACCTATCTC
RPOB	F	AACGTCGTATCTCCGCACTC
	R	CGATACGGCGTCTCAAGGAA

جدول ۵- برنامه درجه حرارت و زمان جهت تکنیک Real-Time PCR

مرحله	دما (°C)	زمان	تعداد سیکل
Pre-denaturation	۹۴	۳ دقیقه	۴۰
Amplification	۹۴	۲۰ ثانیه	
	۵۵	۲۰ ثانیه	
	۷۲	۱۰ ثانیه	
Melting	۹۵	۱۵ ثانیه	
	۵۸	۱ دقیقه	
	۹۵	۱۵ ثانیه	

یافته‌ها

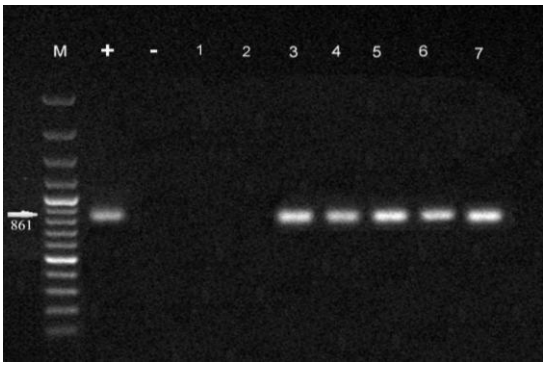
در این مطالعه نتایج آنتی بیوگرام نشان داد که موثرترین آنتی‌بیوتیک علیه ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه آنتی‌بیوتیک ایمی پنم می‌باشد بیشترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (٪۶۰/۴۵)

می‌باشد. همچنین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آزترونام، سفالوتین، سفتریاکسون، سفتازیدیم (۵۰٪ ≤) در سطح بالایی می‌باشد و آنتی‌بیوتیک‌های نظیر آمیکاسین و سیپروفلوکساسین، آنتی‌بیوتیک‌های موثری علیه ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه بودند. بیشترین مقاومت حد واسط در میان آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی در این مطالعه نسبت به آنتی‌بیوتیک ایمی پنم مشاهده شد. جدول ۶ جزئیات بدست آمده از نتایج آنتی بیوگرام را نشان می‌دهد. نتایج دیسک‌های ترکیبی جهت شناسایی فنوتیپی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه نشان دادند که تعداد ۴۶ (۹۲٪) نمونه به طور فنوتیپی دارای آنزیم‌های ESBL بودند.

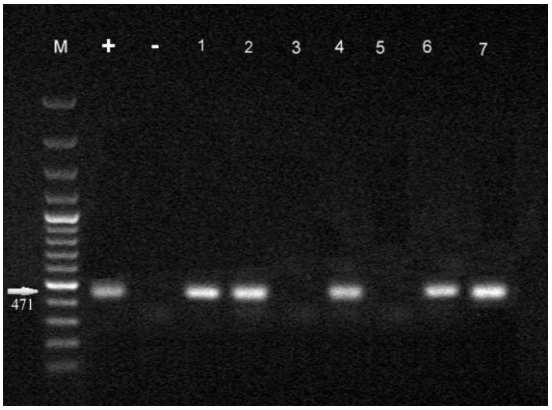
جدول ۶- درصد مقاومت ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه علیه آنتی‌های مختلف

آنتی‌بیوتیک	حساس	نیمه حساس	مقاوم	کلبسیلا دارای ESBL	کلبسیلا فاقد ESBL	سطح معنی داری
ایمی پنم	٪ ۸۶/۴	٪ ۴/۱	٪ ۹/۴	٪ ۱۴/۲	٪ ۰/۰	۰/۰۰۱
آزترونام	٪ ۴۷/۸	٪ ۰/۰	٪ ۵۲/۱	٪ ۷۳/۹	٪ ۰/۰	۰/۰۰۰
آمیکاسین	٪ ۷۲/۹	٪ ۱۰/۱	٪ ۱۶/۹	٪ ۳۰/۴	٪ ۰/۰	۰/۰۰۵
سفالوتین	٪ ۳۹/۳	٪ ۱/۴	٪ ۵۹/۲	٪ ۹۶/۶	٪ ۱۷/۵	۰/۰۰۳
سفتازیدیم	٪ ۴۵/۰۵	٪ ۰/۰	٪ ۵۴/۸۵	٪ ۹۳/۷	٪ ۰/۰	۰/۰۰۰
سفتریاکسون	٪ ۴۳	٪ ۰/۰	٪ ۵۶/۹	٪ ۹۶/۳	٪ ۵/۱	۰/۰۰۰
سفوتاکسیم	٪ ۳۶/۲۵	٪ ۳/۲	٪ ۶۰/۴۵	٪ ۹۶/۸	٪ ۸/۳	۰/۰۰۰
سیپروفلوکساسین	٪ ۸۳/۹	٪ ۳/۸	٪ ۱۲/۲	٪ ۲۹/۵	٪ ۰/۰	۰/۰۰۴

براساس نتایج PCR از تعداد ۴۶ (۹۲٪) نمونه که به طور فنوتیپی دارای آنزیم‌های ESBL، تعداد ۲۲(۴۴٪) سویه دارای ژن‌هایSHV ، ۶ مورد (۱۲٪) دارای ژن TEM ، و ۱۸ مورد (۳۶٪) دارای هر دو ژن SHV و TEM بودند (شکل ۱ و ۲).



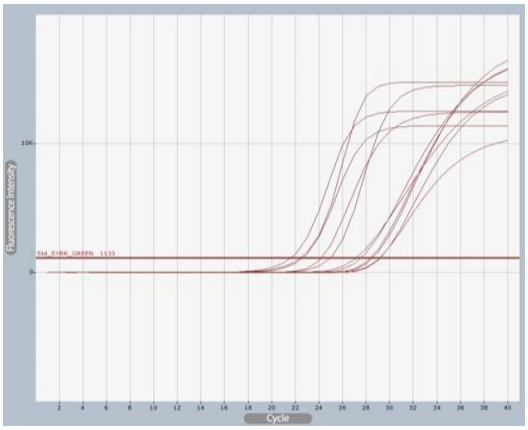
شکل ۱- ژل آگاروز حاوی قطعه ۸۶۱ pb تکثیر شده ژن TEM. از چپ به راست : M مارکر یا لدر (DNA ladder ۱۰۰bp)، کنترل مثبت (کلبسیلا پنومونیه ATCC 700603) ، کنترل منفی (اشرشیا کلی ATCC 25922) نمونه‌های شماره ۱و۲ از لحاظ حضور ژن TEM منفی ، نمونه‌های شماره ۳و۵،۴و۶و۷ از لحاظ حضور ژن TEM مثبت اعلام گردید.



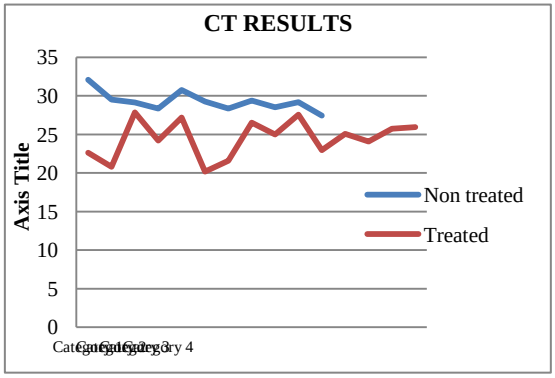
شکل ۲- ژل آگاروز حاوی قطعه ۴۷۱ pb تکثیر شده ژن SHV : از چپ به راست : M مارکر یا لدر (DNA ladder ۱۰۰bp)، کنترل مثبت(کلبسیلا پنومونیه ATCC 700603)، کنترل منفی (اشرشیا کلی ATCC 25922) نمونه‌های شماره ۳و۵ از لحاظ حضور ژن SHV منفی، نمونه‌های شماره ۱و۲و۴و۶و۷ از لحاظ حضور ژن SHV مثبت اعلام گردید.

نتایج Real- Time PCR نشان داد که بیان ژن‌های SHV و TEM در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه دارای ژن‌های SHV و TEM تیمارشده با نانوذره آهن نسبت

به ایزوله تیمار نشده با نانوذره آهن پایین تر بوده است. که نشان دهنده نقش مثبت نانوذره آهن در کاهش بیان ژن‌های SHV و TEM در ایزوله‌های مقاوم بوده است (شکل ۳ و ۴).



شکل ۳- نتایج نمونه های مورد آزمایش با روش Real Time PCR



شکل ٤- نتایج Real Time PCR برای ژن های SHV , TEM در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه تیمار شده و تیمار نشده با نانوذره آهن

بحث

کلبسیلا پنومونیه از باکتری‌های گرم منفی می‌باشد که از نظر کلینیکی نقش مهمی در ایجاد عفونت بیمارستانی و عفونت مجاری ادراری ایفا می‌کند. متاسفانه مصرف بی رویه ی آنتی‌بیوتیک‌ها در دهه‌های اخیر موجب افزایش ظهور سویه‌های مقاوم با مقاومت چند گانه ی دارویی در باکتری‌های روده‌ای گرم منفی از جمله کلبسیلا پنومونیه شده است، به طوری که این باکتری‌ها با تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف یا ESBL نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر سفالوسپورین، پنی سیلین، سیپروفلوکساسین و سفوتاکسیم مقاومت نشان می‌دهند و وجود ژن کد کننده ی آنزیم‌های بتالاکتامازی و انتقال آن در بین باکتری‌های گرم منفی روده ای یک تهدید بزرگ برای مصرف کنندگان سفالوسپورین‌های با طیف وسیع به شمار می‌آیند[۱۵ و ۱۶]. در این مطالعه مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آزترونام، سفالوتین، سفتریاکسون، سفتازیدیم در سطح بالایی وجود داشت که مقاومت به این چهار آنتی‌بیوتیک بالای ۵۰٪ بود که در آینده می‌تواند این مقاومت‌ها بیشتر شده و ایجاد مشکلاتی در درمان کند، از طرفی حدود ۹۰٪ سویه‌ها به ایمی پنم حساس بودند. مطالعات زیادی در ایران انجام شده است که تایید کننده نتایج بدست آمده از این مطالعه می‌باشد.

در مطالعه ای که مشعوف و همکاران در همدان در سال 2014 انجام دادند، موثرترین آنتی‌بیوتیک علیه ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه آنتی‌بیوتیک ایمی پنم اعلام شد[۱۷] و با اینکه مقاومت به این آنتی‌بیوتیک در اکثر مطالعات بسیار پایین می‌باشد اما باید توجه داشت از مصرف بی رویه این آنتی‌بیوتیک در درمان جلوگیری شود تا مقاومت به این آنتی‌بیوتیک افزایش نیابد. همچنین در مطالعه ای که توسط فیض آبادی و همکاران در تهران در سال ۲۰۱۰ انجام شد تمامی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه به آنتی‌بیوتیک ایمی پنم حساس بودند و مقاومت به سیپروفلوکساسین و افلوکساسین در سطح پایینی وجود داشت اما مقاومت به سفالوسپورین‌ها در سطح بالایی وجود داشت [۱۷و۱۸] این نتایج با نتایج بدست آمده از مطالعه ما مطابقت دارد که می‌تواند ناشی از قرابت این گونه ها در این مناطق باشد.

جزایری و همکاران میزان مقاومت سویه‌های کلبسیلا پنومونیه نسبت به آنتی‌بیوتیک

سیپروفلوکساسین را در شهر سمنان ۹۲/۶٪ گزارش نمودند[۱۹]. در تحقیقی که به وسیله پیروزی و همکاران بر روی باکتری کلبسیلا پنومونیه در شهر اصفهان انجام شد، مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک آمیکاسین را ۵۳/۵٪ گزارش نمودند[۲۰]. این نتایج با نتایج حاصل از مطالعه حاضر تفاوت زیادی دارد که این اختلاف می‌تواند ناشی از عوامل اپیدمیولو ژیکی، شرایط جغرافیایی، معیارهای کنترل عفونت در بیمارستان و نحوه تجویز آنتی بیوتیک باشد.

در مطالعه ای که توسط خسروی و همکاران انجام شد از ۵۵ ایزوله کلبسیلا پنومونیه ۲۶ ایزوله(۴۷٪) از نظر بتالاکتامازهای وسیع الطیف مثبت بودند. در بین سویه‌های ESBL مثبت بیشترین مقاومت به آموکسی سیلین کلاولانیک اسید (۱۰۰٪) دیده شد. این سویه‌ها بیشترین حساسیت را به ایمی پنم نشان دادند(۱۴٪)[۲۱]. بر اساس نتایج حاصل از پژوهش میرصالحیان و همکاران در سال ۲۰۰۶ در ایران مشخص گردید ۷۶/۷۴ ٪ درصد از گونه‌های کلبسیلا جداسازی شده از بخش‌های مراقبت ویژه مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف بوده اند[۲۲]. در سال ۲۰۰۰ بر اساس گزارشی منتشره از Surveillance SENTRY Antimicrobial شیوع بتالاکتامازهای وسیع الطیف در گونه‌های کلبسیلا ۱۹٪ درصد گزارش شده است[۲۳]. براساس مطالعات Winokur در سال ۲۰۰۱ بیشترین شیوعESBL در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه جداسازی شده از آمریکای لاتین با شیوع ۴۵ درصد و کمترین میزان با شیوع ۵ درصد در کانادا گزارش شده است[۲۴]. مقایسه نتایج فوق نشان می دهد که میزان شیوع ژن‌های بتالاکتاماز در ایزوله‌های جدا شده از کشورهای مختلف و نیز در یک کشور از یک بیمارستان به بیمارستان دیگر متفاوت است که این امر بستگی به سیستم کنترل درمانی و رژیم درمانی مورد استفاده در هر منطقه و بیمارستان دارد.

در مطالعه ای که توسط خسروی و همکاران انجام شد، شیوع ژن‌های SHV و TEM در ایزوله‌های ESBL مثبت به ترتیب ۱۲ مورد (۴۶/۵٪) و ۹ مورد(۳۴/۶٪) بود. چهار ایزوله به طور همزمان دارای ژن‌های TEM و SHV بودند[۲۱]. این نتایج نشان داد که بین سویه‌های موردبررسی، شیوع ژنSHV بیشترین درصد آماری را به خود اختصاص داد که با نتایج مطالعه حاضر هم خوانی دارد.

در بررسی فیض آبادی و همکاران در سال ۱۳۸۹در تهران همه ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه به ایمی پنم حساس بودند که ۶۹/۷٪ ایزوله‌ها تولیدکننده ESBL بودند. همچنین شیوع ژن‌های TEM وSHV به ترتیب ۵۴٪ و ۶۷/۴٪ بود[۵]. که نسبت به مطالعه حاضر شیوع بیشتری دارند. اختلاف در شیوع موارد فنوتیپ مثبت و ژنوتیپ مثبت را باید در حضور سایر ژن‌های مولد مقاومت بتالاکتامازی گروه A جستجو کرد که در مناطق مختلف نیز از وفور متفاوتی برخوردارند.

در بررسی که توسط Harward و همکاران بین سال‌های ۱۹۹۱ تا ۱۹۹۵ در استرالیا انجام شد، ۱۲ ایزوله کلبسیلا را یافتند که دارای توالی ژن‌های بتالاکتاماز SHV بودند[۲۵].

Lin و همکاران (۲۰۰۶) به شناسایی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی بتالاکتاماز وسیع الطیف در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه پرداختند. در ۲۴ سویه انتخاب شده، SHV-1A در ۱۴سویه پیدا شد، SHV-1 در ۷ سویه؛ SHV-26، SHV-27، و SHV-41 در یک سویه تشخیص داده شد. با این حال، همه ۲۴ سویه واجد ژن TEM-116 بود. در ۷ سویه کلبسیلا پنومونیه مولد ESBL، SHV-5A در ۵ سویه پیدا شد، در حالی که SHV-5 و CTX-M-9 گروه در ۱ سویه تشخیص داده شد [۲۶]. تفاوت مشاهده شده بین پژوهش حاضر و پژوهش‌های ذکرشده فوق می‌تواند به علت وجود تأثیر ژن‌های دیگر مانند CTX و OXA

در ایجاد مقاومت باشد. به علاوه تنوع روش‌های ژنوتیپی مورداستفاده در تحقیقات مختلف نیز می‌تواند از دلایل این اختلاف نتایج باشد.

در مطالعه حاضر علاوه بر شناسایی کلبسیلا پنومونیه دارای ژن‌های TEM و SHV از نمونه‌های بالینی و بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها، به ارزیابی اثر نانوذرات آهن بر بیان این ژن‌ها نیز پرداخته شد.

کرمی و همکاران در سال ۱۳۹۲ تأثیر نانوذرات نقره بر کلبسیلای مولد آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف را مورد بررسی قرار دادند. تعداد ۶۱ ایزوله بالینی کلبسیلا از نظر تولید آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف تعیین شدند و در ادامه، تأثیر محلول‌های نانو ذره نقره با غلظت‌های مختلف بر روی باکتری‌های جداسازی شده مورد بررسی قرار گرفت. تمامی نمونه‌ها در بررسی با روش Double Disk برای اثبات ESBL مثبت و نسبت به محلول نانو ذره نقره با غلظت ppm ۵۰۰ حساس بودند[۲۷]. نتایج مطالعه کرمی و همکاران نشان داد که می‌توان از محلول‌های نانو ذره نقره به عنوان یک جایگزین جدید و مؤثر به جای آنتی بیوتیک‌ها استفاده کرد.

امجدی و همکاران در سال ۱۳۹۴ اثر نانوذرات اکسید مس روی ژنوم باکتری اشریشیاکلی با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که نانوذره اکسید مس با قطر کمتر از ۲۰ نانومتر در دُزهای ۳۰ و۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر دارای خواص ضدمیکروبی به نسبت خوبی بود و توانست تقریباً رشد تمامی باکتری‌های موجود در نمونه را مهار کند[۲۸].

Jin-Hyung Lee و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه ای به بررسی تاثیر نانوذره اکسید روی بر روی بیان ژن‌های ویرولانس و تشکیل بیوفیلم در سودموناس آئروژینوزا با روش RT-PCR پرداختند. یون‌های روی و نانوذرات ZnO به طور قابل توجهی مانع از تشکیل بیوفیلم و تولید پیوسیانین، سیگنال کینولون (PQS) pyochelin و فعالیت همولیتیک سودوموناس آئروژینوزا شدند[۲۹].

Hoseinzadeh و همکاران به بررسی اثر سینرژیستی نانو ذرات اکسید مس و اکسید روی تجاری علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی با استفاده از شاخص غلظت مهاری نسبی (FIC) پرداختند که فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات با استفاده از حداقل غلظت مهار کنندگی رشد (MIC) و مطالعات زمان مرگ بررسی گردید. نانوذرات تجاری Cuo و ZnO مورد استفاده در این مطالعه علیه همه‌ی سویه‌های مورد بررسی دارای فعالیت ضد میکروبی بالایی بوده، ترکیب آن‌ها برای بعضی سویه‌ها باعث افزایش اثر باکتری کشی می‌شود[۳۰]. با وجود نتایج خوبی که نانوذرات در شرایط آزمایشگاهی در درمان و کنترل عوامل میکروبی نشان دادند، برای استفاده کاربردی در علوم پزشکی، می‌توان از نانوذرات به عنوان جایگزین مناسب برای آنتی‌بیوتیک استفاده کرد. فناوری نانو با ایجاد مواد نوظهور که هر روزه با خاصیت‌های جدید تولید می‌کند امید جدیدی برای پژوهشگران محیط زیست در بهبود آلودگی فراهم آورده است.

در این مطالعه تعداد ۴۶ نمونه از جدایه‌ها به صورت فنوتیپی مولد ESBL مثبت بودند. که در ۴۶ ایزوله مولد ESBL، ۴۸ درصد (۲۲ مورد) واجد ژن SHV به تنهایی و ۱۳ درصد (۶ مورد) واجد ژن TEM به تنهایی و ۳۹ درصد (۱۸ مورد) دارای هر دو ژن SHV +TEM بودند.

نتیجه‌گیری

با بررسی فوق و نتایج مشابه توسط سایر محققان می‌توان به این نتیجه رسید که مصرف بی رویه آنتی‌بیوتیک‌ها باعث مقاومت باکتری‌ها به

آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود. با اثبات اثربخش‌بودن نانوذرات آهن بر روی کلبسیلاهای بتالاکتاماز مثبت جداساز ی شده از عفونت‌های مختلف، می توان در آینده با انجام تحقیقات گسترده تر در شرایط in vitro و نیز پژوهش‌هایی در شرایط in vivo از این نانو ذرات استفاده بیشتری کرد. همچنین می‌توان اثر دیگر نانوذرات بر روی ژن‌های مقاومت کلبیسیلا پنومونیه و اثر نانو ذره آهن بر روی بیان سایر ژن‌ها سنجیده شود. می‌توان از نانوذره آهن بعنوان یک دوز دارویی با تحقیقات بیشتر در مدل حیوانی و همچنین در مدل کشت سلولی بررسی شود.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

تشکر و قدردانی

این مقاله قسمتی از پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی می‌باشد که با کد ۶۳۷۳۰۵۴۸۹۵۲۰۰۱ در تاریخ ۱۳۹۶/۶/۳۱ در دانشگاه آزاد اسلامی سیرجان به تصویب رسیده است. نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از همکاران و پرسنل محترم بخش میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان و همچنین سرکار خانم زهرا معصومعلی‌نژاد تقدیر و تشکر نمایند.

منابع و مآخذ

1. Kim MH, Lee HJ, Park KS, Suh JT. Molecular characteristics of extended spectrum β-lactamases in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae and the prevalence of qnr in extended spectrum β-lactamase isolates in a tertiary care hospital in Korea. *Yonsei Med. J.* 2010;51(5):768-74.
2. Larson LL, Ramphal R. Extended-spectrum beta-lactamases. In Seminars in respiratory infections. 2002; 17(3): 189-194.
3. Blondeau JM. Extended-spectrum beta-lactamases. In Seminars in respiratory infections. 2001; 16(3): 169-176.
4. Pitout JD, Gregson DB, Church DL, Elsayed S, Laupland KB. Community-wide outbreaks of clonally related CTX-M-14 β-lactamase-producing Escherichia coli strains in the Calgary health region. *J. Clin. Microbiol*. 2005;43(6):2844-9.
5. Feizabadi MM, Delfani S, Raji N, Majnooni A, Aligholi M, Shahcheraghi F, Parvin M, Yadegarinia D. Distribution of bla TEM, bla SHV, bla CTX-M genes among clinical isolates of Klebsiella pneumoniae at Labbafinejad Hospital, Tehran, Iran. *Microb. Drug Resist.* 2010;16(1):49-53.
6. Kievit FM, Wang FY, Fang C, Mok H, Wang K, Silber JR, Ellenbogen RG, Zhang M. Doxorubicin loaded iron oxide nanoparticles overcome multidrug resistance in cancer in vitro. *J. Controlled Release*. 2011;152(1):76-83.
7. Patil YB, Swaminathan SK, Sadhukha T, Ma L, Panyam J. The use of nanoparticle-mediated targeted gene silencing and drug delivery to overcome tumor drug resistance. *Biomaterials*. 2010;31(2):358-65.
8. Aruoja V, Dubourguier HC, Kasemets K, Kahru A. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO2 to microalgae Pseudokirchneriella subcapitata. *Sci. Total Environ*. 2009;407(4):1461-8.
9. Beranová J, Seydlová G, Kozak H, Benada O, Fišer R, Artemenko A, Konopásek I, Kromka A. Sensitivity of bacteria to diamond nanoparticles of various size differs in gram-positive and gram-negative cells. *FEMS Microbiol. Lett*. 2014;351(2):179-86.
10. Bogdanović U, Lazić V, Vodnik V, Budimir M, Marković Z, Dimitrijević S. Copper nanoparticles with high antimicrobial activity. *Mater. Lett*. 2014;128:75-8.
11. Bondarenko O, Ivask A, Käkinen A, Kahru A. Sub-toxic effects of CuO nanoparticles on bacteria: kinetics, role of Cu ions and possible mechanisms of action. *Environ. Pollut*. 2012;169:81-9.
12. Chatterjee S, Bandyopadhyay A, Sarkar K. Effect of iron oxide and gold nanoparticles on bacterial growth leading towards biological application. *J. Nanobiotechnol*. 2011;9(1):34.
13. Lal P, Kapil A, Das BK, Sood S. Occurrence of TEM & SHV gene in extended spectrum [beta]-lactamases (ESBLs) producing Klebsiella sp. isolated from a tertiary care hospital. *Indian J. Med. Res*. 2007;125(2):173.
14. Saadatian Farivar A, Nowroozi J, Eslami G, Sabokbar A, Hashemi A. The study of antibiotic resistance among Klebsiella pneumoniae and expression level of oqxA and acrA genes by using real-time PCR. *Res. Med*. 2016;40(1): 42-48.
15. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 2001;65(2):232-60.
16. Subha A, Ananthan S. Extended spectrum beta lactamase (ESBL) mediated resistance to third generation cephalosporins among Klebsiella pneumoniae in Chennai. *Indian J. Med. Microbiol.* 2002;20(2):92.
17. Mashouf RY, Alijani P, Saidijam M, Alikhani MY, Rashidi H. Study of Antibiotic Resistance Pattern and Phenotypic Detection of ESBLs in Klebsiella Pneumoniae Strains Isolated from Clinical Samples

and Determination of Minimum Inhibitory Concentrations of Imipenem and Ceftazidim Antibiotics. *Sci. J. Hamadan Univ. Med. Sci.* 2014;20(4):295-302.

18. Feizabadi MM, Mahamadi-Yeganeh S, Mirsalehian A, Mirafshar SM, Mahboobi M, Nili F, Yadegarinia D. Genetic characterization of ESBL producing strains of Klebsiella pneumoniae from Tehran hospitals. *J. Infect. Dev. Countries*. 2010;4(10):609-15.

19. Langharizadeh N, Ahangharzadeh Rezai M, Aghazadeh M, Hasani A. Comparison of the prevalence of drug resistance in Klebsiella pneumoniae Urinary Tract Infection children and adults with educational health centers of Tabriz. *Biol Sci J Islamic Azad Uni, Zanjan Branch*. 2010; 12(4): 9-17. (Full Text in Persian)

20. Pirouzi A, Jafari M, Kargar M, Mohsenzadeh M, Feizabadi MM, Afkari R. Molecular Detection of Simultaneous Occurrence of Antibiotic-and Heavy Metal-Resistance in Klebsiella Pneumoniae Isolated from Urinary Tract Infection. *J. Isfahan Med. Sch*. 2012;30(186).

21. Khosravi AD, Hoveizavi H, Mehdinejad M. Prevalence of Klebsiella pneumoniae encoding genes for CTX-M-1, TEM-1 and SHV-1 extended-spectrum beta lactamases (ESBL) enzymes in clinical specimens. *Jundishapur J. Microbiol*. 2013;6(10).

22. Mirsalehian A, Nakhjavani F. Prevalence of ESBLs producing Enterobacteria in intensive care units. Proceeding of the 8 th National Congress of Microbiology. Isfahan: Isfahan University; 2006.

23. Gordon KA, Jones RN. SENTRY Participant Groups (Europe, Latin America, North America). Susceptibility patterns of orally administered antimicrobials among urinary tract infection pathogens from hospitalized patients in North America: comparison report to Europe and Latin America. Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. 2003;45(4):295-301.

24. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum β-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin. Infect. Dis*. 2001;32(Supplement_2):S94-103.

25. Howard C, van Daal A, Kelly G, Schooneveldt J, Nimmo G, Giffard PM. Identification and minisequencing-based discrimination of SHV β-lactamases in nosocomial infection-associated Klebsiella pneumoniae in Brisbane, Australia. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2002;46(3):659-64.

26. Lin TL, Tang SI, Fang CT, Hsueh PR, Chang SC, Wang JT. Extended-spectrum β-lactamase genes of Klebsiella pneumoniae strains in Taiwan: recharacterization of shv-27, shv-41, and tem-116. *Microb. Drug Resist.* 2006;12(1):12-5.

27. Karami M, Amirmozaffari N, Dody M. A Study of the Effect of Silver Nanoparticles on Extended Spectrum Beta-Lactamase Producing Klebsiella Strains. *Qom Univ. Med. Sci. J.* 2013;7(3).

28. Amjady F, Golestani Imani B, Karimi F. An investigation of the effect of copper nanoparticles on E.coli genome by RAPD molecular markers". *J. Cell. Mol. Rec*.2015; 28(4): 475-487.

29. Lee JH, Kim YG, Cho MH, Lee J. ZnO nanoparticles inhibit Pseudomonas aeruginosa biofilm formation and virulence factor production. *Microbiol. Res.* 2014;169(12):888-96.

30. Hoseinzadeh E, Alikhani MY, Samarghandy MR. Evaluation of synergistic effect of commercial zinc oxide and copper oxide nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria by fraction inhibitory concentration index. *J .Zanjan .Univ Med. Sci. Health Serv.* 2012;20(82): 31-43.